

Instructivo de Uso

NCPanaftosa - Prueba Tamiz – Bovino

Kit diagnóstico para detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales del Virus de la Fiebre Aftosa

**Conjunto de reactivos para la detección *in vitro* de anticuerpos contra la
poliproteína 3ABC del Virus de la Fiebre Aftosa para el estudio de 880
muestras de suero bovino / Búfalo
(*Bubalus bubalis*)**

USO VETERINARIO

ÍNDICE

1.	NOMBRE Y USO RECOMENDADO	2
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
3.	PRINCIPIO DEL ENSAYO.....	2
4.	CUIDADOS Y PRECAUCIONES	3
5.	REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT	3
6.	MATERIAL Y EQUIPOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS	5
6.1.	Material de laboratorio	5
6.2.	Equipos.....	5
6.3.	Suero control interno.....	5
7.	MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	5
8.	PROCEDIMIENTO	6
8.1.	Procedimientos preliminares.....	6
	TABLA I – Volúmenes a preparar en función del número de muestras	6
	TABLA II – Preparación del conjugado y sustrato en función del número de placas	7
8.2.	Ejecución del ensayo	7
	Resumen de los procedimientos del ensayo	9
9.	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS	10
9.1.	Criterio de aceptación de la placa.....	10
9.2.	Cálculo e interpretación de resultados.....	10
9.3.	Control de calidad interno.....	10
10.	CONSIDERACIONES GENERALES	11
10.1.	Eventuales problemas y posibles causas	11
10.2.	Consideraciones metodológicas.....	11
11.	DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO DE LA PRUEBA	11
12.	BIBLIOGRAFÍA	13
13.	ANEXO	14

1. NOMBRE Y USO RECOMENDADO

El kit denominado "NCPanaftosa - Prueba Tamiz – Bovino" está integrado por un conjunto de reactivos necesarios para la realización de un ensayo inmunoenzimático que permite la detección *in vitro* de anticuerpos contra la proteína no capsidal (PNC) 3ABC del Virus de la Fiebre Aftosa (VFA). Este ensayo, que consiste en una prueba de I-ELISA (Indirect – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), fue padronizado como prueba tamiz de un sistema que usa el "NCPanaftosa - Prueba Confirmatoria – Bovino" EITB (Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot), como prueba confirmatoria. Su uso está recomendado en la vigilancia activa de la Fiebre Aftosa en poblaciones bovinas menores de 2 años. El kit también fue validado para su uso en sueros de Búfalo (*Bubalus bubalis*) en las mismas condiciones que para el bovino.

2. INTRODUCCIÓN

La Fiebre Aftosa, enfermedad infecciosa que afecta a los animales biungulados, es causada por el VFA. Los animales infectados presentan en general lesiones (aftas) en la boca y patas, pudiendo ocurrir el establecimiento de infección subclínica, inclusive estando vacunados, que se puede hacer persistente, y de duración variable, que en el bovino puede extenderse a más de dos años. Debido a esta característica, la demostración fehaciente de ausencia de actividad viral es esencial para acompañar la evolución de los programas de erradicación.

El presente ensayo, desarrollado para evaluar actividad viral en poblaciones animales, introdujo un enfoque diagnóstico innovador, basado en la detección de anticuerpos contra la proteína no capsidal 3ABC del VFA, como marcador de exposición al virus activo. Puede ser usado independientemente del estado de vacunación del animal. Como las PNC son altamente conservadas entre los diferentes serotipos, la prueba puede ser aplicada para investigación de cualquier serotipo del VFA.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo se realiza en 3 etapas: 1. Incubación de las muestras (sueros de bovino/bubalino); 2. Incubación del conjugado; y 3. Incubación del sustrato. Siguen a las dos primeras etapas ciclos de lavado y a la última la adición de la solución bloqueadora para detener la reacción.

Incubación de las muestras: la proteína 3ABC, inmovilizada en la microplaca, al entrar en contacto con la muestra, reaccionará con los anticuerpos específicos (de estar presentes) formando el complejo inmune antígeno-anticuerpo. Otros anticuerpos presentes en la muestra (no específicos), no reaccionarán y serán eliminados en la etapa de lavado que sigue a la incubación, quedando solo los anticuerpos anti-3ABC adheridos a la placa a través de la proteína 3ABC.

Incubación del conjugado: en esta etapa se agrega el conjugado (anticuerpos anti-IgG de bovino con peroxidasa), que se unirá específicamente al anticuerpo bovino en el complejo antígeno-anticuerpo (de haberse formado). De no formarse el complejo en la etapa anterior, el conjugado no se unirá y será eliminado durante el lavado que sigue a este paso.

Incubación del sustrato: en esta tercera etapa se adiciona el sustrato incoloro TMB / H₂O₂ sobre el cual actúa la enzima peroxidasa del conjugado. Como resultado de la acción de la misma se observará el surgimiento de color azul en aquellos pocillos en que el antígeno haya retenido anticuerpos anti-3ABC y consecuentemente conjugado. Por último, la reacción es interrumpida al agregarse ácido sulfúrico, que provoca el viraje del color azul al amarillo.

Se efectúa la lectura de la microplaca en la lectora de placa y se mide la absorbancia de cada uno de los pocillos. Los resultados de los sueros controles permiten clasificar las muestras problema. .

4. CUIDADOS Y PRECAUCIONES

- Todos los componentes del kit deben conservarse en heladera (2 °C a 8 °C).
- Conservar los materiales en sus envases originales.
- Respetar el plazo de validez que figura en la etiqueta de la caja.
- No usar ni mezclar componentes de otros kits, lotes o fabricantes.
- Seguir estrictamente el procedimiento recomendado para la ejecución del ensayo.
- Todos los materiales del kit se destinan a reacciones *in vitro* y deben ser manipulados cumpliendo buenas prácticas de laboratorio (BPL).
- No usar soluciones que presenten señales de alteración tales como precipitado, turbidez, etc.. De observarse, entrar en contacto con PANAFTOSA.
- Manipular las muestras y los sueros controles cumpliendo BPL.
- El sustrato deberá ser manipulado con cuidado, ya que contiene dimetilsulfóxido (DMSO) que es fácilmente absorbido por la piel.
- Evitar el contacto con la solución bloqueadora. De ocurrir, lavar abundantemente con agua.
- Todos los materiales y residuos de la prueba (placas, frascos y líquidos resultantes de las diferentes etapas) deberán ser tratados antes de ser eliminados. Se recomienda autoclavar durante 45 minutos a 121 °C a 1 atmósfera o tratar con hipoclorito de sodio a concentración final de 5% durante 1 hora.

5. REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT

Composición

- 5.1. Microplacas sensibilizadas con la proteína 3ABC **MP** 10 microplacas
Microplacas con 96 pocillos sensibilizadas con la proteína recombinante 3ABC del VFA purificada . Listas para su uso. Conservar en heladera (2 °C a 8 °C).
- 5.2. Solución PBS – Tween 20x concentrada **PB** 2 frascos conteniendo 160 ml cada uno
Solución PBS – Tween 20, concentrado 20 veces y con conservante, para la preparación de la solución de lavado, y del diluyente de muestra/conjugado, según lo indicado en los "Procedimientos preliminares" (Pág. 6). Conservar en heladera (2 °C a 8 °C).
- 5.3. *Escherichia coli* **EC** 1 tubo conteniendo 450 µl
Lisado de *Escherichia coli* para adicionar al diluyente de muestra/conjugado según lo indicado en los "Procedimientos preliminares" (Pág. 6). Conservar en heladera (2 °C a 8 °C).

- 5.4. Leche en polvo descremada **LP** 1 bolsa plástica conteniendo 25 g
- Leche en polvo descremada, para adicionar al diluyente de muestra/conjugado según lo indicado en los "Procedimientos preliminares" (Pág. 6). Una vez abierto el sobre, mantener el resto del contenido herméticamente cerrado en heladera (2 °C a 8 °C).
- 5.5. Suero equino **SE** 1 frasco conteniendo 45 ml
- Suero equino irradiado y con conservantes, para adicionar al diluyente de muestra/conjugado según lo indicado en los "Procedimientos preliminares" (Pág. 6). Conservar en heladera (2 °C a 8 °C).
- 5.6. Suero Control Negativo **CN** 1 tubo conteniendo 130 µl
- Suero bovino sin anticuerpos contra el VFA, tratado con cloroformo y BEI, con conservante. Manipular según lo indicado en "Incubación de las muestras" (Pág. 7). Conservar en heladera (2 °C a 8 °C). Centrifugar antes de su uso.
- 5.7. Suero Control Padrón 1 **CP1** 1 tubo conteniendo 170 µl
- Suero bovino con anticuerpos contra la proteína 3ABC del VFA, tratado con cloroformo y BEI, con conservante. Manipular según lo indicado en "Incubación de las muestras" (Pág. 7) Conservar en heladera (2 °C a 8 °C). Centrifugar antes de su uso.
- 5.8. Suero Control Padrón 2 **CP2** 1 tubo conteniendo 130 µl
- Suero bovino con anticuerpos contra la proteína 3ABC del VFA, tratado con cloroformo y BEI, con conservante. Manipular según lo indicado en "Incubación de las muestras" (Pág. 7) . Conservar en heladera (2 °C a 8 °C). Centrifugar antes de su uso.
- 5.9. Conjugado 100x concentrado **CJ** 1 tubo conteniendo 1,2 ml
- Anticuerpos de conejo anti-IgG bovino conjugados con peroxidasa, con estabilizante. Diluir según lo indicado en la Tabla II (Pág. 7). Conservar en heladera (2 °C a 8 °C).
- 5.10. Diluyente de sustrato **DS** 1 frasco conteniendo 120 ml
- Solución de ácido cítrico en buffer fosfato con peróxido de hidrógeno, específica para la dilución del sustrato. Conservar en heladera (2 °C a 8 °C). Lista para su uso.
- 5.11. Sustrato 100x concentrado **ST** 1 tubo conteniendo 1,2 ml
- Solución de tetrametilbencidina (TMB) en dimetilsulfóxido (DMSO), 100x concentrada. Diluir según lo indicado en la Tabla II (Pág. 7). Conservar en heladera (2 °C a 8 °C).
- 5.12. Solución bloqueadora **SB** 1 frasco conteniendo 120 ml
- Solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N. Lista para su uso. Conservar en heladera (2 °C a 8 °C).

6. MATERIAL Y EQUIPOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

6.1. Material de laboratorio

- Pipeta multicanal de volumen ajustable (100 µl) y micropipetas monocanal de volumen ajustable (10 ó 20, 100 y 1000 µl), con precisión y exactitud verificada. Punteras descartables adecuadas a las micropipetas; garantizar que las mismas no retengan inmunoglobulinas lo que puede interferir con los resultados del test.
- Placas auxiliares de 96 pocillos para la dilución previa de las muestras (opcional). Garantizar que las mismas no retengan anticuerpos anti-3ABC.
- Papel secante.
- Material de laboratorio para preparar las soluciones.
- Agua deionizada y/o destilada.
- Hipoclorito de sodio para tratar el material a descartar (materiales y soluciones resultantes de la prueba).

6.2. Equipos

- Lavadora de placas manual o automática.
- Estufa $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- Lectora de microplacas con filtros para lectura a 450 y 620 nm.
- Homogeneizador tipo vórtex.
- Balanza.
- Microcentrífuga tipo Eppendorf o similar.

Seguir las instrucciones de los fabricantes para el uso, frecuencia de calibración y mantenimiento.

6.3. Suero control interno

- Suero bovino con desempeño conocido.

7. MANEJO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el manejo y conservación de los sueros recomendamos:

- Conservarlos en heladera (2°C a 8°C) no más de 2 días; para períodos mayores, conservarlos a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.
- Evitar repetidos ciclos de congelamiento / descongelamiento.
- No usar sueros contaminados o que presenten precipitados.
- Homogeneizar los sueros antes de usarlos.

8.1. Procedimientos preliminares

- Antes de comenzar la prueba, retirar los siguientes reactivos de la heladera (Microplacas, PBS 20x, Diluyente de Sustrato y Solución Bloqueadora), para permitir que se estabilicen a temperatura ambiente (TA), 20°C – 25°C. Preparar diluyente de muestra/conjugado y la solución de lavado 1x dejándolos estabilizar también a TA. Devolver suero equino, E. coli, y leche a la heladera. Retirar los otros reactivos (sueros padrones, sueros problema, conjugado 100x y sustrato 100x) en el momento de su uso.
- Preparar la planilla de la prueba (Pág. 14), teniendo en cuenta que deben usarse 2 pocillos para el suero Control Negativo (CN), 3 pocillos para el suero Control Padrón 1 (CP1), 2 pocillos para el suero Control Padrón 2 (CP2) y 1 pocillo para el Suero control interno por placa.
- Homogeneizar los reactivos antes de su uso.
- Preparar las soluciones necesarias para la prueba en función del número de muestras (placas) a procesar siguiendo lo especificado en la Tabla I.

TABLA I – Volúmenes a preparar en función del número de muestras

Número de muestras	Buffer de lavado	Diluyente de muestra / conjugado
1 placa = 88 muestras	500 ml	30 ml
2 placas = 176 muestras	1000 ml	60 ml
3 placas = 264 muestras	1500 ml	90 ml
4 placas = 352 muestras	2000 ml	120 ml
5 placas = 440 muestras	2500 ml	150 ml

- ❖ Buffer de lavado: Diluir 20 veces con agua deionizada y/o destilada la solución PBS – Tween 20x (**PB**). De observarse precipitados en la solución **PB**, disolverlos en Baño María a 37°C ± 0,5°C previo a la dilución.
- ❖ Diluyente de muestras/conjugado: Para preparar 100 ml de esta solución, disolver 5 g de leche descremada (LP) en aproximadamente 50 ml de buffer de lavado (preparado anteriormente). Adicionar 10 ml suero equino, 100 µl de *Escherichia coli* (EC), homogeneizar y llevar a volumen final con buffer de lavado (preparado anteriormente). Preparar en el momento de uso un volumen suficiente para cada prueba, descartando el volumen no utilizado al final de la prueba.
- ❖ La dilución del conjugado y del sustrato debe realizarse 5 - 10 minutos antes de su uso, de acuerdo a lo especificado en la Tabla II.

TABLA II – Preparación del conjugado y sustrato en función del número de placas

Número de placas	Diluyente de muestra / conjugado	Conjugado 100x	Diluyente de sustrato	Sustrato 100x
1	11 ml	110 µl	11 ml	110 µl
2	22 ml	220 µl	22 ml	220 µl
3	32 ml	320 µl	32 ml	320 µl
4	42 ml	420 µl	42 ml	420 µl
5	52 ml	520 µl	52 ml	520 µl

8.2. Ejecución del ensayo

Incubación de las muestras

- Colocar 95 µl de diluyente de muestra/conjugado en todos los pocillos. Adicionar 5 µl de muestra o suero control (dilución final 1:20) en el pocillo asignado, siguiendo el orden establecido en la planilla de la prueba. Utilizar una puntera nueva para cada muestra. No deben transcurrir más de 10 minutos entre la dilución del primero y el último suero, a fin de garantizar la correcta interpretación de los resultados.

Opcional. En caso de no poder efectuar la dilución de los sueros en un tiempo máximo de 10 minutos, se puede pre-diluir las muestras problema en una placa auxiliar virgen (sin sensibilizar). Para ello, colocar 190 µl de diluyente de muestra/conjugado en los pocillos de las muestras problema, respetando las posiciones definidas en la planilla de la prueba y adicionar 10 µl de muestra por pocillo. Homogeneizar las diluciones. Usar una puntera nueva para cada muestra. Transferir con pipeta multicanal 100 µl de las muestras pre-diluidas a la placa sensibilizada, respetando las posiciones de las mismas. Los sueros controles no deben ser pre-diluidos; adicionarlos en la forma descripta anteriormente.

- Sellar la placa e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos $\pm 0,5$ minutos.
- Antes de finalizar la etapa de incubación de las muestras preparar el conjugado diluido según lo indicado en la Tabla II (Pág. 7).

Lavado

- Concluida la etapa de incubación de las muestras vaciar la placa, evitando que trasborde líquido de un pocillo para otro, lavar la placa en 3 ciclos dobles (total 6 veces) evitando que trasborde líquido de un pocillo para otro como también que las agujas de la lavadora toquen el fondo de la placa. La cuidadosa ejecución de esta etapa es fundamental para obtener un buen resultado. Si no se dispone de lavadora automática el lavado podrá ser realizado manualmente. Concluidos los ciclos de lavado eliminar todo resto de solución golpeando la placa invertida sobre papel secante.

Incubación del conjugado

- Adicionar 100 µl de conjugado diluido por pocillo. Sellar la placa e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos $\pm 0,5$ minutos.
- Antes de acabar la etapa de incubación del conjugado preparar el sustrato-cromógeno, según lo indicado en la Tabla II (Pág. 7). Caso la temperatura ambiente esté por debajo de 20°C , se aconseja estabilizar el volumen de diluyente de sustrato necesario para la prueba durante 10 minutos a 37°C . Una vez estabilizado, preparar el sustrato-cromógeno y usar inmediatamente.

Antes de usar el sustrato concentrado **verificar que esté líquido y homogéneo (punto de fusión 18°C)**. La solución final preparada de sustrato diluido debe ser incolora o de un color amarillo pálido. De observarse color más intenso descartar la solución y preparar una nueva.

Lavado

- Proceder del modo indicado en la etapa anterior de lavado.

Incubación del sustrato-cromógeno

- Adicionar 100 µl de sustrato-cromógeno diluido a cada pocillo e incubar a TA durante 15 minutos $\pm 0,5$ minutos.
- Adicionar 100 µl de solución bloqueadora a cada pocillo.

Lectura de la placa

- La lectura de la placa debe ser realizada en un plazo máximo de 30 minutos después de la adición de la solución bloqueadora. Realizar lectura con doble filtro: 450 nm y 620 nm para corrección automática de blanco.

Resumen de los procedimientos del ensayo

Etapa	Volumen	Procedimiento
<u>Dilución de las muestras</u>		
Dil. muestra/conjugado	95 µl	Adicionar a cada pocillo en toda la placa.
Controles y muestras*	5 µl	Adicionar en los pocillos asignados y homogeneizar suavemente.
* <u>Muestras pre-diluidas (opcional)</u>		
Dil. muestra/conjugado	190 µl	Adicionar en cada pocillo de toda la placa auxiliar.
Muestra	10 µl	Adicionar en los pocillos asignados y homogeneizar suavemente.
	100 µl	Transferir de la placa auxiliar a la placa sensibilizada.
<u>Incubación de las muestras</u>		Cubrir la placa. Incubar durante 30 minutos a 37°C. 2 minutos antes del inicio del lavado preparar el conjugado diluido.
<u>Lavado</u>	6 x ~0,3 ml	Lavar en 3 ciclos dobles (6 veces).
<u>Incubación del conjugado</u>		
Conjugado diluido	100 µl	Adicionar a cada pocillo. Cubrir la placa. Incubar durante 30 minutos a 37°C. 2 minutos antes del inicio del lavado preparar el sustrato diluido.
<u>Lavado</u>	6 x ~0,3 ml	Lavar en 3 ciclos dobles (6 veces).
<u>Incubación del sustrato</u>		
Sustrato diluido	100 µl	Adicionar a cada pocillo. Incubar durante 15 minutos a 20°C–25°C (TA).
<u>Bloqueo de la reacción</u>		
Solución bloqueadora	100 µl	Adicionar a cada pocillo. Leer la absorbancia a 450/620 nm en un plazo máximo de 30 minutos.

9 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterio de aceptación de la placa

La placa será válida solamente si los sueros controles cumplen los siguientes requisitos.

- Suero Control negativo (**CN**) – El valor de absorbancia de cada una de las réplicas debe ser inferior a 0,1. Si cumple calcular la media.
- Suero Control Padrón 1 (**CP1**) - El valor de absorbancia de cada una de las réplicas, luego de sustraer el valor de absorbancia de la media del control negativo (**CN**), debe ser superior a 0,15. Si sólo una de las réplicas esta fuera de rango, podrá ser desconsiderada, calculando la media con los otros 2 valores. Si los valores son aceptables, calcular la media.
- Suero Control Padrón 2 (**CP2**) – Sustraer del valor de absorbancia de cada réplica el valor de la media del CN. Calcular la media.
- La relación **CP2/CP1** deberá ser igual a 2,1, con una variación máxima de $\pm 25\%$.

De no cumplir con los requisitos detallados la placa deberá ser considerada inválida y deberá ser repetida. De persistir el problema, entrar en contacto con PANAFTOSA.

9.2. Cálculo e interpretación de resultados

Expresar los resultados en relación al Suero Control Padrón 1 (**CP1**) como:

$$T/C = (\text{Abs. del suero en análisis} - \text{media Abs. CN}) / (\text{media CP1}^*)$$

* Calculada como referido en el punto 9.1)

La muestra deberá ser considerada:

- no reactiva para valores de $T/C < 0,8$.
- inconclusiva o sospechosa para valores de $0,8 \leq T/C < 1$.
- reactiva para valores de $T/C \geq 1$.

Obs: Caso la prueba sea utilizada para análisis comparativo de muestras colectadas de un mismo animal recomendamos que el procesamiento de las mismas sea realizado en una única placa.

9.3. Control de calidad interno

A fin de evaluar la ejecución de la prueba en su laboratorio, a lo largo del tiempo y en las condiciones locales, se recomienda la confección de curvas con los valores de absorbancia de las réplicas (duplicados/triplicados) de los sueros controles (CN, CP1 y CP2), así como de las medias calculadas para los mismos, obtenidos diariamente, de acuerdo a las especificaciones del ítem 9.1. En este contexto se sugiere el envío a PANAFTOSA de los resultados de absorbancia de los sueros controles de todas las pruebas procesadas, para su acompañamiento.

10. CONSIDERACIONES GENERALES

10.1. Eventuales problemas y posibles causas

- ausencia total de reacción o coloración extremadamente tenue – Verifique calidad del agua; mantenga el excedente de conjugado y sustrato diluidos hasta el final de la prueba, con el fin de confirmar que ocurre el desarrollo de color mezclando ambas soluciones. Controlar posibles retenciones en punteras y placas auxiliares.
- sueros controles fuera del rango – Verifique la temperatura de la sala y de la estufa; controle que los tiempos de incubación sean los recomendados, confiera el estado de calibración de las micropipetas; verifique la calidad del lavado del material, y la calidad del material descartable.
- resultados no reproducibles – verifique el estado de calibración de las micropipetas; certifíquese que los procedimientos de lavado sean los recomendados. Controle que no haya contaminación química o microbiológica de los tubos y válvulas utilizados en los sistemas de lavado. Compruebe el estado de calibración de la lectora de placas. Verifique la calidad del lavado del material, y la calidad del material descartable.

10.2. Consideraciones metodológicas

La prueba está basada en la detección de anticuerpos. Debe tenerse en cuenta que la presencia de los mismos no necesariamente indica presencia del virus, ya que pueden estar reflejando no solo infección presente, sino también infección pasada. Asimismo, es importante resaltar que existe un intervalo temporal entre la exposición al virus y la formación de anticuerpos. Ensayos realizados con el NCPanaftosa Prueba Tamiz - Bovino en animales experimentalmente infectados permitieron establecer que el proceso de seroconversión puede detectarse a partir de los 7 días post infección.

11. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO DE LA PRUEBA

- La especificidad, estimada con animales vírgenes, provenientes de áreas libres sin vacunación de América del Sur y Europa resultó en valores que excedieron el 98%.
- La sensibilidad calculada para animales con comprobada infección persistente, establecida en forma experimental y en animales de campo no vacunados, en América del Sur y Europa llega al 100%. Para animales vacunados y con comprobada infección persistente, la sensibilidad se aproxima al 100%. Sin embargo, cuando se incluyeron animales con infección persistente no comprobada, y probablemente sin riesgo de transmisión de virus (aquellos con resultados positivos para PCR o aislamiento viral sólo en raras ocasiones, y en períodos próximos a la exposición), los valores disminuyeron (aproximadamente 97,2%).
- En animales vacunados en áreas libres con vacunación sistemática, los valores de especificidad diagnóstica pueden variar según la pureza de las vacunas en relación a su contenido de PNCs, así como al número de vacunaciones. En este sentido se recomienda el uso de vacunas que no induzcan respuesta de anticuerpos anti PNC en animales vacunados / revacunados. En general, vacunas purificadas mediante métodos convencionales no inducen una respuesta

de anticuerpos que pueda interferir con la evaluación de los muestreos, aunque puede observarse un efecto de desplazamiento de valores negativos aproximándose hacia el valor de corte, con valores de especificidad cercanos a 97% en animales < 2 años.

- Se recomienda el uso de la prueba confirmatoria (NCPanaftosa Prueba Confirmatoria - Bovino) para trabajar con valores de especificidad mayores, de forma tal de no comprometer el valor predictivo positivo en áreas de baja prevalencia.
- Cabe mencionar los resultados de modelos bovinos experimentales de PANAFTOSA en los cuales se estudiaron muestras pareadas de líquido esofágico-faríngeo (LEF) y sueros. Estas fueron colectadas de 85 bovinos (37 no vacunados y 48 vacunados), infectados o expuestos al VFA bajo condición controlada. La colecta de las muestras se realizó **durante el estado comprobado de infección** (esto es, previo a la última recuperación viral positiva a partir de LEF). Independientemente del estado de vacunación, los resultados sugieren que la sensibilidad diagnóstica del sistema NCPanaftosa (Pruebas Tamiz/Confirmatoria) **relativa** a muestras LEF positivas ($n = 436$) es 100%, (muestras positivas a LEF eran aquellas en las que el virus pudo ser aislado). En cambio, la sensibilidad de aislamiento por LEF **relativa** a resultados positivos mediante NCPanaftosa (Pruebas Tamiz/Confirmatoria) ($n = 893$) en estos animales solo alcanzó valores de 48,8%
- Un mejor aprovechamiento de los resultados puede obtenerse a partir de la construcción de gráficos de distribución de frecuencia de reactividades de anticuerpos resultando en perfiles que reflejan poblaciones con diferente situación epidemiológica.
- En las referencias bibliográficas se ejemplifican perfiles obtenidos para poblaciones representativas de las siguientes situaciones epidemiológicas:
 - ♦ poblaciones de animales de áreas libres sin vacunación,
 - ♦ animales experimentalmente infectados,
 - ♦ poblaciones de animales involucrados en brotes de fiebre aftosa,
 - ♦ poblaciones de animales menores de 2 años de áreas con vacunación sistemática sin enfermedad clínica en los últimos 4 años,
 - ♦ poblaciones de animales mayores de 2 años de áreas con vacunación sistemática sin enfermedad clínica en los últimos 4 años.

1. Bergmann I.E., Augé de Mello P., Neitzert E., Beck E & Gomes I. (1993) Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. Am. J. Vet. Res., 54: 825-831.
2. Bergmann I.E. (1994) Uso de la prueba de EITB para identificaciones de áreas con ausencia de actividad viral. Veterinaria, 70: 16 - 20.
3. Bergmann I.E. & Malirat V. (1995) Performance of a rapid enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa, 61: 1 - 5.
4. Bergmann I.E., Malirat V., Dias L.E. & Dilandro R. (1996) Identification of foot-and-mouth disease virus-free regions by use of a standardized enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. Am. J. Vet. Res., Vol. 57, No. 7: 972-974.
5. Bergmann I.E., Astudillo V., Malirat V. & Neitzert E. (1998) Serodiagnostic strategy for estimation of foot-and-mouth disease viral activity through highly sensitive immunoassays using bioengineered nonstructural proteins. The Veterinary Quarterly, Vol. 20, Sup. 2: S6-S9.
6. Bergmann I.E., Malirat V., Neitzert E., Panizzutti N., Sánchez C. & Falczuk (2000) Improvement of serodiagnostic strategy for FMDV surveillance in cattle under systematic vaccination: A combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. Archives of Virology, Vol. 145 : 473-489
7. Bergmann I. & Neitzert E. (2000) Fiebre Aftosa. Instrumentos seroepidemiológicos para evaluar actividad viral. I-ELISA 3ABC y EITB - Sistema para detección de anticuerpos contra antígenos no estructurales del Virus de la Fiebre Aftosa. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Manual técnico, Rio de Janeiro.
8. Bergmann I.E., Malirat V., Neitzert E. & Correa Melo E. (2003) Validation of the I-ELISA 3ABC / EITB System for Use in Foot-and Mouth Disease Surveillance: Overview of the Southamerican Experience. Foot-and-Mouth Disease: Control Strategies, 361-370. Elsevier SAS Eds.
9. Bergmann I.E., Malirat V., Neitzert E. & Correa Melo E. (2003) Vaccines and Companion Diagnostic Tests for Foot-and-Mouth Disease Virus. An overview of the Experience in South America. Vaccines for OIE List A and Emerging Animal Diseases. Dev Biol. Basel, Karger. 114: 57-63. Brown F. Roth eds.
10. Bergmann I.E., Neitzert N., Malirat V., Ortiz S., Colling A., Sánchez C. & Correa Melo E. (2003) Rapid Serological Profiling by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and its Use as an Epidemiological Indicator of Foot-and-Mouth Disease Viral Activity. Archives of Virology, Vol. 148: 891-901.
11. Bergmann I.E., Malirat V. & Neitzert E. (2003) Instrumentos Diagnósticos para la Vigilancia de la Fiebre Aftosa. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa OPS/OMS. Selección de Trabajos del Seminario Internacional sobre Uso de Instrumentos Seroepidemiológicos y Viroológicos en la Vigilancia de Fiebre Aftosa, Santiago, Chile, 10-11 de Marzo. En prensa.
12. Bergmann I.E., Malirat V. & Neitzert E. (2003) Pruebas Serológicas y Viroológicas en la Vigilancia Activa de la Fiebre Aftosa. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa OPS/OMS. Selección de Trabajos del Seminario Internacional sobre Uso de Instrumentos Seroepidemiológicos y Viroológicos en la Vigilancia de Fiebre Aftosa, Santiago, Chile, 10-11 de Marzo. En prensa.
13. Malirat V., Neitzert E., Bergmann I.E., Maradei E. & Beck E. (1998) Detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus by means of an indirect ELISA test using bioengineered nonstructural polyprotein 3ABC. The Veterinary Quarterly, Vol. 20, Sup. 2: S24-S26.
14. Neitzert E., Beck E., Augé de Mello P., Gomes I. & Bergmann I.E. (1991) Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infections. Virology, 184: 799-804.
15. Office International des Epizooties. World organisation for animal health. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. (2000) OIE, Paris.
16. Charting Methods for internal Quality Control in Methods in Molecular Biology - The ELISA Guidebook. Crowther, J.R., Human Press Inc. (2001): 347-394.

